

**Мелешикина Ольга Игоревна**

канд. мед. наук, врач, ведущий эмбриолог, лабораторный генетик

**Лаврушина Елена Николаевна**

заведующая отделением, врач акушер-гинеколог, репродуктолог

**Якунин Анатолий Анатольевич**

врач уролог, андролог

Межрайонный перинатальный центр

ГБУЗ СО «Тольяттинская городская клиническая больница №5»

г. Тольятти, Самарская область

DOI 10.31483/r-102396

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТИКУЛЯРНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ,  
ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ОТКРЫТОЙ БИОПСИИ ЯИЧКА, В ЛЕЧЕНИИ  
БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ У ПАР С АЗООСПЕРМИЕЙ  
(ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НА БАЗЕ ТОЛЬЯТТИНСКОЙ ГОРОДСКОЙ  
КЛИНИЧЕСКОЙ БОЛЬНИЦЫ № 5)**

***Аннотация:** оценена эффективность лечения бесплодия пар с азооспермией при помощи экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с интрацитоплазматической инъекцией (ИКСИ) тестикулярными сперматозоидами. Средний возраст мужчин составил  $35,8 \pm 8,7$  лет, средний возраст женщин  $31,5 \pm 4,7$  лет. Частота получения зигот составила в среднем 74,4%, частота дробления – 98,3%, частота бластуляции – 63,6%. Всего нами было проведено 25 переносов эмбрионов в полость матки 16 женщинам, мужья которых страдали азооспермией. Получено 13 беременностей (частота наступления беременности – 52,0%), 8 из них закончились срочными родами одним живым плодом (частота завершения беременности родами 61,5%). Метод открытой биопсии яичка (TESE) с последующей экстракцией сперматозоидов и использование их в циклах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) показал свою успешность в реализации репродуктивного потенциала у мужчин с азооспермией.*

**Ключевые слова:** мужское бесплодие, бесплодие, азооспермия, открытая биопсия яичка, криоконсервация сперматозоидов, ИКСИ тестикулярными сперматозоидами, криоконсервация эмбрионов, перенос эмбрионов.

По данным ВОЗ, около 15% сексуально активных пар репродуктивного возраста не достигают беременности в течение 1 года и обращаются к специалистам по этому поводу. В конечном счете 5% пар остаются бездетными, несмотря на многочисленные попытки лечения. У половины (50%) бездетных пар бесплодие связано с «мужским фактором», проявляющимся отклонениями в параметрах эякулята. В ряде случаев женщина с хорошей способностью к зачатию может компенсировать субфертильность мужчины, поэтому чаще бесплодие проявляется при снижении фертильности у обоих партнеров [13].

По данным российских авторов и урологической ассоциации США частота встречаемости азооспермии или полного отсутствия сперматозоидов в эякуляте составляет 2% в общей популяции и достигает 15% от общего числа бесплодных мужчин [2; 4]. Единственным шансом реализации репродуктивного потенциала для таких пациентов является хирургическое извлечение семенных канальцев из яичка с последующим поиском сперматозоидов, пригодных для использования в программе ВРТ. Успешность получения сперматозоидов при TESA (чрезкожной аспирации сперматозоидов из яичка – testicular sperm aspiration), по данным разных авторов, составляет от 26 до 42%, а при TESE (открытой биопсии яичка с последующей экстракцией сперматозоидов – testicular sperm extraction) от 43% до 64% [1; 6]. Методика открытой биопсии позволяет получить большее количество материала и, соответственно, большее количество сперматозоидов, пригодных для оплодотворения ооцитов, а также, в купе с замораживанием нескольких доз тестикулярных сперматозоидов, дает увеличение вероятности благоприятного исхода лечения бесплодия у таких пар. Актуальность замораживания нескольких доз выше у пар с сочетанной формой бесплодия, когда получение большого количества зрелых ооцитов (стадии МII) проблематично (имеется в виду снижение овариального резерва у партнерши).

В связи с этим *целью* данного исследования является оценка эффективности лечения бесплодия в цикле ВРТ у пар с азооспермией при проведения открытой биопсии яичка с последующей экстракцией сперматозоидов и проведением экстракорпорального оплодотворения по технологии ЭКО/ИКСИ.

*Материалы и методы.* Был проведен ретроспективный анализ 16 пар с азооспермией, находящихся на учете по бесплодию в консультативно-диагностическом отделении межрайонного перинатального центра (КДО МПЦ) ГБУЗ СО «ТГКБ №5» города Тольятти. Пациентам проводилась двукратная оценка эякулята, согласно рекомендациям ВОЗ, 5 пересмотр, 2010 г [13]. А также проводилось андрологическое обследование, исследование гормонального статуса – фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина, тестостерона, ингибина – В, исследование инфекционного статуса методом ПЦР (хламидии, уреаплазмы, микоплазмы), цитогенетическое исследование кариотипа периферической крови, молекулярно-генетическое исследование на наличие делеций локуса AZF (a, b, c) и гена SRY. Пациенты с отклонениями от нормы в кариотипе, локусе AZF или гене SRY исключались из исследования. Мужчина с подтвержденным диагнозом «Азооспермия» (необструктивная или обструктивная формы) направлялся на проведение диагностической открытой биопсии яичка (TESE). При отсутствии в биоптате сперматозоидов паре предлагалось воспользоваться спермой донора. При получении суспензии, содержащей сперматозоиды, она делилась на две порции, криоконсервировалась с использованием среды SrermFreeze (FertiPro, Бельгия) и пара входила в программу ВРТ.

После стимуляции суперовуляции и получения ооцитов у женщины, ее супругу проводили повторную экстракцию паренхимы яичка с последующим механическим выделением сперматозоидов: отмывали полученный материал в NEPES – среде (Flashing Medium, Origio, Дания), перетирали семенные канальца через клеточный фильтр (Falcon, США), затем суспензию центрифугировали на 500g, удаляли супернатант и отмывали средой Sperm Washing (Irvine Scientific,

США). Оплодотворение ооцитов тестикулярными сперматозоидами производили по технологии ИКСИ после поиска подвижных спермиев с нормальной морфологией. В случае получения малого количества или отсутствия сперматозоидов пригодных для оплодотворения в свежем материале использовали криоконсервированную дозу пациента.

*Результаты.* Ежегодно в КДО МПЦ города Тольятти обращается 500–800 пар с проблемами зачатия. При исследовании эякулята в 51,4% случаев выявляются патологические и субфертильные образцы, требующие коррекции и в 48,6% случаев регистрируется нормозооспермия. Частота встречаемости азооспермии составляет 3% среди всех исследуемых в лаборатории КДО образцов и 5,7% среди образцов мужчин, имеющих отклонения в эякуляте. Методика TESE используется в центре с 2019 года и за три года было проведено 39 диагностических открытых биопсии яичка. Из них в 20 пробах (51,3%) были обнаружены сперматозоиды, что соответствует данным литературных источников [1; 6]. Материал обрабатывался, замораживался и хранился в криохранилище лаборатории КДО в жидком азоте при  $-196^{\circ}\text{C}$ . Затем 16 пар вступили в цикл вспомогательных репродуктивных технологий. Средний возраст мужчин составил  $35,8 \pm 8,7$  лет, средний возраст женщин  $31,5 \pm 4,7$  лет. Продолжительность бесплодия от 1 года до 3-х лет. У 9 пар диагностировалось первичное бесплодие, изолированный мужской фактор, азооспермия. У 7 пар – первичное бесплодие, сочетанный фактор. В день трансвагинальной пункции фолликулов у женщины мужчине проводилась повторная открытая биопсия другого яичка с последующим выделением сперматозоидов, активацией их с помощью среды Sperm Washing (Irvine Scientific, США) и подогреванием до  $37^{\circ}\text{C}$  в термостате, оплодотворением зрелых ооцитов стадии МII методикой ИКСИ. Оплодотворение ооцитов оценивалось на 1-е сутки (через 16–18 часов после проведения ИКСИ). Частота оплодотворения составила в среднем 74,4%, (детекция двух пронуклеусов и двух полярных тел), частота дробления – 98,3%, частота бластуляции – 63,6%, частота образования бластоцист «хорошего качества» – 45,8% [10; 11]. В 43,7% (7 пациенткам) осу-

ществили перенос одного или двух эмбрионов в полость матки на 3 сутки развития (3eSET или 3eDET). В 18,8% случаев (3 пациентки) был выполнен селективный перенос одного эмбриона на стадии бластоцисты (5eSET) и 37,5% (6 пациенток) была осуществлена криоконсервация всех бластоцист отличного и хорошего качества (тактика «Freezeall»), в соответствии с классификацией D. Gardner и Schoolcraft [5]. Из 16 TESE/ИКСИ нам удалось витрифицировать эмбрионы 5 дня развития 14-и парам (87,5%). В результате 10 переносов «свежих» эмбрионов на 3 сутки развития наступило 4 клинические беременности, частота наступления беременности (ЧНБ) составила 40%, но все они остановились в развитии на сроках 6–12 недель беременности. У двух пациенток удалось провести кариотипирование хориональной ткани после прерывания беременности и в обоих случаях кариотип был патологический (47,XX,+16 – трисомия 16 пары хромосом и 47,XY,+21 – трисомия 21 пары хромосом). Из трёх 5eSET наступило 2 клинические беременности (ЧНБ 66,7%), одна из которых окончилась выкидышем 8–9 н.б., а вторая благополучно завершилась срочными самопроизвольными родами одним живым плодом. Частота наступления беременности после переноса «свежих» эмбрионов в полость матки составила 46,2%, частота живорождения – 16,7%. Большое количество прерываний беременности мы связываем с высокой частотой хромосомных аномалий тестикулярных сперматозоидов мужчин как с обструктивной, так и необструктивной формой азооспермии – 14%–17%–20,3%, что подтверждается многочисленными литературными данными [2; 3; 12], а также отсутствием должной селекции эмбрионов на третьи сутки развития. Впоследствии были проведены еще 12 криопереносов эмбрионов 5 дня развития отличного качества. В результате наступило 7 клинических беременностей (ЧНБ 58,3%), которые завершились срочными родами одним живым плодом (частота завершения беременности родами 100%). По данным многих авторов частота наступления беременности при проведении ИКСИ тестикулярными сперматозоидами составляет 32,0%–32,8% [2; 3; 7; 8; 9]. В нашем случае, благодаря молодому возрасту женщин (31,5±4,7 лет), более тщательной селекции эмбрионов

(бластоцисты отличного и хорошего качества 5 дня развития) и более физиологическим условиям переноса эмбрионов в полость матки (в цикле без стимуляции суперовуляции) нам удалось достичь других показателей. Всего нами было проведено 25 переносов эмбрионов в полость матки 16 женщинам, мужа которых страдали азооспермией. Получено 13 беременностей (ЧНБ 52%), 8 из них закончились срочными родами одним живым плодом (частота завершения беременности родами 61,5%).

*Заключение.* Использование процедуры ИКСИ сперматозоидами, полученными при помощи открытой биопсии яичка у мужчин с азооспермией, является большим достижением современной медицины и показало высокую эффективность лечения бесплодия. Благодаря работе нашего отделения 8 пар из 16 стали счастливыми родителями. В лаборатории КДО продолжает храниться криоконсервированный материал TESE 13 из 16 мужчин и у 10 пар хранятся криоконсервированные эмбрионы 5 суток развития. Безусловно, это увеличивает возможности наших пациентов стать родителями генетически своих детей. Проведение преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах ВРТ является очень перспективным и всё более распространенным инструментом в лечении бесплодия, который позволяет отобрать кариотипически нормальные (эуплоидные) эмбрионы для переноса в полость матки, что особенно актуально в программах с использованием тестикулярных сперматозоидов.

### *Список литературы*

1. Аль-Шукри С.Х. Частота обнаружения сперматозоидов и вероятность осложнений после различных видов биопсии яичка (TESA, TESE и micro-TESE у больных с необструктивной азооспермией / С.Х. Аль-Шукри, С.Ю. Боровец, В.А. Торопов [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. – 2016. – №23 (1). – С. 10–4.
2. Кулаков В.И. Лечение женского и мужского бесплодия. Вспомогательные репродуктивные технологии / В.И. Кулаков, Б.В. Леонов, Л.Н. Кузьмичев. – М.: Медицинское информационное агентство, 2005. – 592 с.

3. Хилькевич Л.В. Вспомогательные репродуктивные технологии (PESA и MESA) при лечении бесплодия, обусловленного мужским фактором / Л.В. Хилькевич, В.М. Здановский, С. Тогобецкий, П.А. Гоголевский // Проблемы репродукции. – 1998. – №2. – С. 29–33.
4. American Urological Association Education and Research. – Inc. The management of obstructive azoospermia: AUA best practice statement. Linthicum (MD): American Urological Association Education and Research. – Inc. – 2010.
5. Gardner D.K. Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond. 1999; (11): 378–388.
6. Hauser R., Yogev L., Paz G. et al. Comparison of efficacy of two techniques for testicular sperm retrieval in nonobstructive azoospermia: multifocal testicular sperm extraction versus multifocal testicular sperm aspiration. J Androl 2006; 27(1): 28–33. DOI: 10.2164/jandrol.05055. PMID: 16400074.
7. Hovatta O., Moilanen J., von Smitten K., Remia I. Testicular needle biopsy, open biopsy, epididymal aspiration and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia // Hum. Reprod. – 1995; 10: 2595–2599.
8. Khader K., Guille F., Karmouni T., Griveau J.F., Le Lannou D., Lobel B. Microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA), testicular biopsy and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the treatment of male infertility // Prog Urol. – 1999 Sep; 9(4): 696–702.
9. Schwarzer J.U., Fiedler K., v Hertwig I., Krusmann G., Wurfel W., Schleyer M., Muhlen B., Pickl U., Lochner-Ernst D. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms // Urol Int. – 2003; 70 (2): 119–23.
10. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. Human Reproduction. 2011; 26 (6): 1270–1280.

11. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART Laboratory performance indicators, ESHRE Special Interest Group of embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Reprod Biomed Online. 2017; 35(5): 494–510. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.06.015

12. Tournaye H., Devroey P., LIU J. et al. Microsurgical epididymal sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens // Fertil. Steril. – 1994; 61: 1045–1051.

13. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.